

710

PCT.

世界知的所有権機関
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

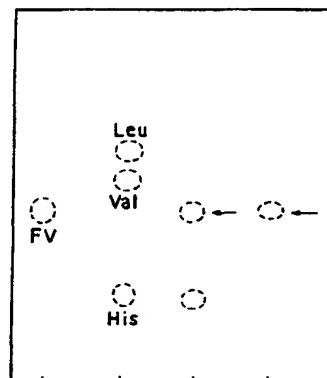
(51) 国際特許分類7 C12N 9/48, 1/20, C12Q 1/37		A1	(11) 国際公開番号 WO00/50579
			(43) 国際公開日 2000年8月31日(31.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00984		(74) 代理人 池内寛幸, 外(IKEUCHI, Hiroyuki et al.) 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満4丁目3番25号 梅田プラザビル401号室 Osaka, (JP)	
(22) 国際出願日 2000年2月21日(21.02.00)			
(30) 優先権データ 特願平11/42926 1999年2月22日(22.02.99) JP 特願平11/142186 1999年4月12日(12.04.99) JP		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 京都第一科学 (KYOTO DAIICHI KAGAKU CO., LTD.)[JP/JP] 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 石丸 香(ISHIMARU, Kaori)[JP/JP] 八木雅之(YAGI, Masayuki)[JP/JP] 米原 聡(YONEHARA, Satoshi)[JP/JP] 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 株式会社 京都第一科学内 Kyoto, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: NOVEL ENZYME

(54)発明の名称 新規酵素

(57) Abstract

A novel enzyme (α -GARE) releasing an amino acid residue (α -GA) having a saccharified α -amino group from glycoproteins, etc. and novel microorganisms producing the same. These microorganisms include *Corynebacterium ulealyticum* KDK1002 (FERM P-17135) and *Pseudomonas alcaligenes* KDK1001 (FERM P-17133). The above α -GARE is contained in the culture supernatant of these microorganisms and α -GA can be released from saccharified peptides by using the same, as the figure shows.



Lane No. 1 2 3 4

a Lane No. 1 コントロール FV
b Lane No. 2 コントロール Leu, Val, His
c Lane No. 3 F2P 分解物
d Lane No. 4 F3P 分解物

a...CONTROL FV
b...CONTROL Leu, Val, His
c...F2P DIGESTION PRODUCT
d...F3P DIGESTION PRODUCT

(57)要約

本発明は、糖化タンパク質等から α -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基(α -GA)を遊離する新規酵素(α -GARE)およびこれを産生する新菌体に関する。前記産生菌としては、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002(FERM P-17135)およびシュードモナス アルカリゲネスKDK1001(FERM P-17133)がある。これらの菌体の培養液上清に前記 α -GAREが含まれ、これを用いれば、図1に示すように、糖化ペプチドから α -GAを遊離できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

新規酵素

技術分野

本発明は、新規酵素に関する。

5

背景技術

プロテアーゼは、様々な産業分野において利用されている。例えば、糖尿病の診断および治療等における重要な指標である血清中の糖化アルブミン等の糖化タンパク質を測定する際にも、前記プロテアーゼが使用

10

されている。

このプロテアーゼを利用した糖化タンパク質の測定方法は、例えば、以下に示すようにして行うことができる。例えば、糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、この分解物とフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）とを反応させ、生成する過酸化水素量または消費される酸素量を測定することにより、前記糖化タンパク質の量を知ることができる。前記プロテアーゼとしては、特開平5-192193号公報、特開平7-289253号公報等の開示されているものが使用されている。

15

このように、糖化タンパク質を予めプロテアーゼで処理するのは、前記FAOD等は、糖化アミノ酸や糖化ペプチドに作用し易く、糖化タンパク質自身には作用し難いからである。特に、糖化ヘモグロビン（以下、「HbA1c」という）は、その糖化部分がβ鎖N末端アミノ酸残基であるため、この部分にFAODが作用しやすいように、HbA1cを処理できるプロテアーゼが求められていた。

20

発明の開示

そこで、本発明の目的は、糖化タンパク質や糖化ペプチド等に対して F A O D が作用しやすいように、前記糖化タンパク質等を処理できる新規酵素の提供である。

本発明者らは、まず、各種 F A O D の中でも、糖が α -アミノ基に結合した糖化タンパク質、糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸等に作用する F A O D について、その作用機構を検討した。その結果、前記 F A O D は、例えば、 α -アミノ基に糖が結合した糖化アミノ酸には良く作用するが、前記糖化タンパク質や糖化ペプチドには作用しがたいことがわかった。そこで、本発明者らは、この知見に基づいて、自然界の様々な菌を分離培養し、それらが産生する酵素を検討した結果、糖が α -アミノ基（N末端アミノ基）に結合した糖化タンパク質または糖化ペプチドから、 α -アミノ基が糖化されたアミノ酸（ α -Glycated Amino acid : 以下、「 α -G A」という）を遊離する新規酵素を産生する菌を分離することに成功し、本発明に至った。本発明の新規酵素（ α -Glycated Amino acid Releasing Enzyme : 以下、「 α -G A R E」という）によれば、例えば、前記糖化タンパク質や糖化ペプチドから α -G A を遊離できるため、 α -G A に良く作用する前記 F A O D を用いた H b A 1 c の測定を臨床検査等で実用化することができる。また、H b A 1 c の測定の他に、他の糖化タンパク質の測定等の様々な分野で使用することもできる。なお、本発明の α -G A R E は、 α -G A を遊離させる触媒機能のほかに、他の触媒機能、例えば、他のペプチド結合を切断する機能等を備えていても良い。本発明者らが分離した新菌体としては、コリネバクテリウム属（Corynebacterium）、シュードモナス（Pseudomonas）属等の菌体がある。なお、本発明の α -G A R E は、これらの菌

体由来に制限されない。

本発明の α -GARE において、遊離される糖化アミノ酸は、その α -アミノ基が糖化されていれば特に制限されないが、前述のように、HbA1c は N 末端バリリン残基が糖化されていることから、前記遊離される α -GA は、糖化バリリン（以下、「 α -GV」という）であることが好ましい。

本発明の α -GARE としては、例えば、以下に示す、二種類の α -GARE がある。

まず、一つめの α -GARE（以下、「 α -GARE-1」という）は、
10 、コリネバクテリウム属（Corynebacterium）の菌体由来であり、特に好ましくは、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002（Corynebacterium ureolyticum KDK1002）由来である。このコリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002（Corynebacterium ureolyticum KDK1002）は、本発明者らが土壤中より新規に単離した菌体であり、
15 り、通商産業省・工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）（日本国〒305-0046 茨城県つくば市東1丁目1-3）に受託番号FERM P-17135（寄託日：平成11年1月11日）で寄託されている。本菌体の菌学的特性は、下記に示すとおりである。

（形態的特性）

20 本菌体の形状は、その大きさが $0.8 \times 1.2 \mu\text{m}$ の桿菌であり、非運動性である。

（培養的性質）

本菌体を常法の寒天培地に生育させた場合、そのコロニー形態は低い凸状の円形であり、前記コロニーの色はクリーム色である。

25 （生理学的性質）

グラム染色性 : 陽性

酸素要求性 :		通性嫌気性
硝酸塩還元 :		—
ピラジナミダーゼ :		+
ピロリドニルアリルアミダーゼ :		—
5	アルカリフォスファターゼ :	—
β -グルクロニダーゼ :		—
β -ガラクトシダーゼ :		—
α -グルコシダーゼ :		—
N-アセチル- β -グルコサミナーゼ :		—
10	エスクリン (グルコシダーゼ) :	—
ウレアーゼ :		+
ゼラチンの液化 :		—
β -溶血性 :		—
炭水化物の発酵性		
15	ブドウ糖 :	—
リボース :		—
キシロース :		—
マンニトール :		—
マルトース :		—
20	乳糖 :	—
白糖 :		—
グリコーゲン :		—

- つぎに、二つ目の α -GARE (以下、「 α -GARE-2」という)
- 25 は、シュードモナス属 (Pseudomonas) の菌体由来であり、特に好ましくは、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (Pseudomonas a

lcaligenes KDK1001) 由来である。前記シュードモナス アルカリゲ
ネス KDK1001 (Pseudomonas alcaligenes KDK1001) も本発明者
らが土壤中より新規に単離した菌体であり、通商産業省・工業技術院生
命工学工業技術研究所 (NIBH) (日本国〒305-0046茨城県つくば市東
5 1丁目1-3) に受託番号FERM P-17133 (寄託日: 平成11年1月11日
) で寄託されている。本菌体の菌学的特性は下記に示すとおりである。

(形態的特性)

本菌体の形状は、その大きさが $0.3 \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ の桿菌で
あり、極毛により運動性を有する。

10 (培養的性質)

本菌体を常法の寒天培地に生育させた場合、そのコロニー形態は低い
凸状の円形であり、表面は滑らかである。前記コロニーの色は半透明か
ら淡黄色に変化する。マックコンケイ (Mac Conkey: 以下、同じ) 培
地で生育は認められるが、良好とはいえない。また、培養温度 40°C で
15 は生育しない。

(生理学的性質)

	グラム染色性 :	陰性
	酸素要求性 :	好気性
	硝酸塩還元 :	+
20	インドール産生 :	-
	ブドウ糖酸性化 :	-
	アルギニンジヒドロラーゼ :	-
	ウレアーゼ :	-
	エスクリン加水分解 :	+
25	ゼラチン加水分解 :	-
	β -ガラクトシダーゼ :	+

	ブドウ糖からのガスの生成	:	—
	基質資化能		
	ブドウ糖	:	+
	L-アラビノース	:	+
5	D-マンノース	:	+
	D-マンニトール	:	+
	N-アセチル-D-グルコサミン	:	—
	マルトース	:	+
	グルコン酸カリウム	:	+
10	n-カプリン酸	:	+
	アジピン酸	:	—
	DL-リンゴ酸	:	+
	クエン酸ナトリウム	:	—
	酢酸フェニル	:	—

15

つぎに、本発明の糖化タンパク質または糖化ペプチドの測定方法は、糖化タンパク質または糖化ペプチドを酵素で分解した後、この分解物と F A O D とを反応させ、この酸化還元反応を測定することにより、前記糖化タンパク質または糖化ペプチドを測定する方法であって、前記酵素として本発明の新規酵素 (α -G A R E) を使用することを特徴とする。

本発明の測定方法において使用する α -G A R E は、測定する糖化タンパク質や糖化ペプチドの種類、それらの濃度等により適宜決定されるが、一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。また、前記 α -G A R E がより作用しやすいように、予め、糖化タンパク質等を別の酵

20

25 素（例えば、プロテアーゼ等）で分解させてもよい。

本発明の測定方法において、前記酸化還元反応の測定は、前記酸化還

元反応によって生じる過酸化水素量の測定または消費される酸素量の測定であることが好ましく、前記過酸化水素量を測定する場合、ペルオキシダーゼと酸化により発色する基質（以下、「発色性基質」という）とを用いた測定であることが好ましい。なお、前記過酸化水素量は、前記
5 ペルオキシダーゼ等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法等により測定することもできる。

前記発色性基質としては、N－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－4，4’－ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミンナトリウム（例えば、商品名DA－64：和光純薬社製等）、オルトフェニレンジア
10 ミン（OPD）、トリンダー試薬と4－アミノアンチピリンとを組み合わせさせた基質等があげられる。前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、アフチルアミン誘導体等があげられる。また、前記アミノアンチピリンの他に、アミノアンチピリン誘導体、バニ
15 リンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン（MBTH）、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン（SMBTH）等も使用できる。これらの発色性基質の中でも、特に好ましくは、N－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－4，4’－ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミンナトリウムである。

20 本発明の測定方法において、前述のように、血球中のHbA1cを測定することは糖尿病の診断に有用であることから、測定対象試料は、血球であることが好ましい。しかし、糖化タンパク質は、例えば、前記血球以外の血液成分（全血、血漿、血清等）、尿や髄液等の生体試料、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食料等にも含まれるため、測定対象
25 試料は前記血球には限定されない。また、測定対象物も、前記HbA1cには制限されず、この他にも、ゼラチン、カゼイン等の糖化タンパク

質や糖化ペプチド等があげられる。

つぎに、本発明の糖化タンパク質または糖化ペプチドの測定キットは、
プロテアーゼ、F A O D、ペルオキシダーゼおよびペルオキシダーゼと
5 の反応により酸化される基質を備える測定キットであり、前記プロテア
ーゼが本発明の α -G A R Eを含むことを特徴とする。この測定キット
によれば、本発明の測定方法を迅速かつ簡便に行うことができる。なお、
前述と同様に、前記 α -G A R Eは一種類でもよいし、二種類以上を併
用してもよい。

10 本発明の測定キットにおいて、前記酸化される基質としては、前述の
ような発色性基質が好ましく、測定対象物および測定対象試料も前述と
同様である。

つぎに、本発明の α -G A R Eの製造方法は、本発明の新菌体を培養
15 する工程を含む方法である。これにより、本発明の α -G A R Eを容易
に製造することができる。

本発明の α -G A R Eの製造方法は、さらに、以下の(a)～(c)
に示す精製工程を含むことが好ましい。

- (a) 培養液から菌体を除去して、上清を調製する工程。
- 20 (b) 前記上清中のタンパク質をエタノール沈殿する工程。
- (c) 前記タンパク質をクロマトグラフィーにより分離する工程。

前記精製工程は特に制限されず、その他の精製工程を組合わせてもよ
い。また、例えば、(a)工程だけでもよいし、2以上の工程を行っても
よく、さらに同じ工程を繰り返し行ってもよい。

25 前述のような菌体培養によって得られる本発明の α -G A R Eは、培
養液中に含有された状態でも、精製された状態であってもよく、糖化タ

ンパク質等から α -G Aを遊離させる限り、その精製度に拘わらず使用できる。しかし、精製すれば、培養液中の α -G A R E以外の成分が除去されるため、前記 α -G A R Eの比活性が向上する。これにより、実際に使用する際に、その使用量が少量でよく、取り扱いが簡便になる。

- 5 また、各種反応に用いる場合に、 α -G A R E以外の成分による影響も回避できる。

つぎに、以上のような精製工程により精製された α -G A R Eについて、そのアミノ酸配列の決定および遺伝子配列の決定を行い、本発明の
10 α -G A R Eをコードする遺伝子を調製することが好ましい。なお、この遺伝子は、前記 α -G A R Eが発現するために必要である遺伝子には限定されず、例えば、プローブやプライマーとして使用するDNA断片やRNA等、また、 α -G A R Eの遺伝子配列をもとに作製した化学合成の断片等も含む。このような遺伝子を用いて、例えば、組換え体等を
15 作製し、これにより α -G A R Eを製造してもよい。本発明の α -G A R Eの遺伝子は、例えば、以下に示すようにして得ることができる。

まず、本発明の α -G A R Eを、例えば、後述する精製工程等により精製して、エドマン分解等の常法によりアミノ酸配列の決定を行ない、これをもとにその遺伝子配列を推測する。そして、これに基づいて常法
20 の化学合成等によりDNA断片やRNA断片等を作製し、これをプライマーやプローブ等として使用して、本発明の新規菌体から α -G A R Eをコードする遺伝子をクローニングすれば、本発明の遺伝子が得られる。

25 図面の簡単な説明

図1は、本発明の一実施例において、コリネバクテリウム属の菌体の

培養液上清を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したクロマトグラムである。

図2は、前記一実施例において、コリネバクテリウム属の菌体の培養液上清を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したその他のクロマトグラムである。

図3は、本発明のその他の実施例において、シュードモナス属の菌体の培養液上清を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したクロマトグラムである。

図4は、本発明のさらにその他の実施例において、コリネバクテリウム属の菌体の培養液上清を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をLC-MS分析したトータルイオンクロマトグラムである。

図5は、前記実施例において、コリネバクテリウム属の菌体の培養液上清を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をLC-MS分析したMSスペクトラムである。

図6は、本発明のさらにその他の実施例において、コリネバクテリウム属の菌体由来の α -GARE量と吸光度との関係を表すグラフである。

図7は、本発明のさらにその他の実施例において、シュードモナス属の菌体由来の α -GARE量と吸光度との関係を表すグラフである。

図8は、本発明のさらにその他の実施例において、コリネバクテリウム属の菌体由来の α -GAREの熱安定性を表すグラフである。

図9は、本発明のさらにその他の実施例において、シュードモナス属の菌体由来の α -GAREの熱安定性を表すグラフである。

図10は、本発明のさらにその他の実施例において、コリネバクテリウム属の菌体由来の α -GAREの至適温度を表すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の α -GAREを産生する菌体のスクリーニングは、例えば、以下に示すように、土壤中の菌体を分離培養し、その培養液を用いて糖化ペプチドの分解反応を行い、得られる分解物を薄層クロマトグラフィー（TLC）により分析することによって行うことができる。なお、以下のスクリーニング方法は、 α -GARE産生菌を分離するために、本発明者らが詳細な検討を重ねた結果、見出したものである。このスクリーニング方法の確立によって、本発明の α -GARE産生菌の分離が成功したといっても過言ではない。

10 (1) 培養方法

以下に示す栄養液体培地を、予め、オートクレーブにより、121℃で20分間滅菌する。そして、土壤サンプルを滅菌水に懸濁し、これを前記滅菌済みの栄養液体培地に添加して、30℃で48時間振とう培養（111rpm）を行う。得られた培養液を遠心分離（12,000G、15min、4℃）して、その上清を回収する。

（栄養液体培地）

麦芽エキス（商品名Malt extract：DIFCO社製）	2.0g
D-グルコース（ナカライテスク社製）	2.0g
20 ペプトン（商品名Bacto peptone：DIFCO社製）	0.1g
蒸留水	100ml

（2）糖化ペプチドの分解反応

（糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸の製造方法）

25 そのアミノ酸配列が、HbA1c β 鎖におけるN末端側アミノ酸配列と同様である α -アミノ基糖化ペプチドおよび α -フルクトシルバリン

(以下、「F V」という)を、以下のペプチドおよびバリンと、グルコースとを用いて、常法により作製する。

(ペプチド)

- 5 Val-His (ペプチド研究所社製：以下、この糖化物を「F 2 P」という)

Val-His-Leu (ペプチド研究所社製：以下、この糖化物を「F 3 P」という)

- 10 Val-His-Leu-Thr (バイオリンク社製：以下、この糖化物を「F 4 P」という)

Val-His-Leu-Thr-Pro (SIGMA社製：以下、この糖化物を「F 5 P」という)

Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Ser (バイオリンク社製：以下、この糖化物を「F 9 P」という)

15

(L-アミノ酸)

Val、LeuおよびHis (和光純薬工業社製)

(分解方法)

- 20 予め、前記各糖化ペプチドを0.01Mの濃度になるように蒸留水に溶解し、糖化ペプチド溶液をそれぞれ調製する。そして、前記各糖化ペプチド溶液50 μ lと前記培養液上清100 μ lとをそれぞれ混合し、37℃で一晩反応させた後、これらの反応液を凍結乾燥する。

- 25 (3) TLC分析

前記糖化ペプチドの分解物をTLCにより分析し、 α -GARE活性

の有無を確認する。なお、使用する試薬および方法を以下に示す。

(薄層プレート)

商品名 Pre-Coated TLC plate SILICA GEL 60

5 (メルク社製)

(検出試薬)

ニンヒドリン (フナコシ社製) を 0.5 体積% の濃度になるように、
75 体積% エタノールで溶解する。

10

(展開溶媒)

ブタノール (ナカライテスク社製)、酢酸 (ナカライテスク社製) およ
び蒸留水を、2 : 1 : 1 の体積割合になるように混合する。

15 (分析方法)

予め、展開距離が 8 cm になるように前記薄層プレートを準備し、前
記プレート下端から 1 cm の位置をサンプルスポットの原線とする。そ
して、TLC 分析の直前に、前記凍結乾燥した各反応液を 50 体積% エ
タノール 15 μ l にそれぞれ溶解し、これらをシリンジ (容量 25 μ l
20) により前記原線上にスポットする。なお、コントロールとして、前記
FV および各種アミノ酸も同様にスポットする。そして、前記展開溶媒
で予め飽和された展開槽にこのプレートをいれ、前記原線から約 8 cm
の距離まで前記展開溶媒を上昇させる。なお、前記展開溶媒は、前記プ
レートがその下端から約 0.5 cm まで浸かるように入れておく。

25 前記展開後、ドラフト内で完全に風乾させた前記プレートに前記検出
試薬 (ニンヒドリン溶液) を噴霧してから、予め熱しておいたホットス

ターラー（100℃）により加熱して発色試験を行う。その結果、コントロールのFVと同じ移動度を示すサンプルが α -GARE活性陽性であり、その培養液の菌体が α -GARE産生菌体である。

- 前記TLC分析は、前述のようなニンヒドリン検出には限定されず、
5 例えば、この他にもフルオレスカミン、エチレンジアミン硫酸塩等の試薬を用いた蛍光検出法も採用できる。

また、前記コントロールとしては、例えば、基質である糖化タンパク質または糖化ペプチドの α -GAを使用することが好ましい。

- 10 このようなスクリーニング方法により、発明者らが単離した新菌体としては、例えば、前記コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (Corynebacterium ureolyticum KDK1002) (FERM P-17135) およびシュードモナス アルカリゲネスKDK1001 (Pseudomonas alcaligenes KDK1001) (FERM P-17133) 等がある。

15

- 本発明の α -GAREの検出および活性測定に使用できる基質としては、前述の糖化ペプチド等には制限されず、例えば、N末端の α -アミノ基が糖化されている糖化タンパク質および糖化ペプチド等があげられる。このような基質を用いる場合、例えば、遊離された α -GAに対して、後述するFAODを用いた酸化還元反応（例えば、発色反応等）を行
20 うことにより、 α -GAREを検出・測定することができる。

- 前記糖化タンパク質としては、例えば、HbA1c、糖化グロビン等があげられる。このような糖化タンパク質は、例えば、天然のものでもよいし、糖とタンパク質とのアマドリ転位反応により合成したものでも
25 よい。前記糖化グロビンは、例えば、HPLC等を用いて精製したHbA1cを、テールの方法 (Teale, F.W.J, Biochem, Biophys, Acta, 35, 543, 1

959) によりグロビン化することによって調製できる。合成により各種タンパク質を糖化する場合、使用する糖は特に制限されず、例えば、グルコース等のアルドースや、ケトース等があげられる。

前記糖化ペプチドは、例えば、前述のような糖化タンパク質をプロテ
5 アーゼ分解することにより調製したり、糖と合成ペプチドとのアマドリ
転位により合成できる。糖化ペプチドの長さは、特に制限されないが、
例えば、アミノ酸残基数 2 ~ 20 の範囲であり、好ましくは 2 ~ 8 の範
囲である。

糖とのアマドリ転位反応を行う前記ペプチドは、例えば、天然のもの
10 でもよいし合成ペプチドでもよい。また、そのアミノ酸組成は特に制限
されないが、アルギニンやリジンを含まないペプチドであることが好ま
しい。このようなペプチドを糖化すれば、ペプチドの α -アミノ基のみ
が糖化された糖化ペプチドを調製できるため、この糖化ペプチドを用い
ることによって α -GARE 活性のみを検出できる。

15 具体的に、 α -GARE を HbA1c 測定に利用することを目的とす
る場合、前記糖化ペプチドは、例えば、HbA1c β 鎖における N 末端
側アミノ酸配列と同様の糖化ペプチドであることが好ましく、例えば、
前記「糖化ペプチドの分解反応」において記載した N 末端 Val の α -
アミノ基が糖化された糖化ペプチド等があげられる。また、例えば、H
20 bA1c をトリプシンで分解すれば、N 末端バリンの α -アミノ基が糖
化されているアミノ酸残基数 8 個の糖化ペプチドを得ることができる。

また、 α -GARE の基質として、N 末端の α -アミノ基が糖化され
ている糖化ペプチド等を用いる場合、遊離された α -GA を検出しても
25 よいが、 α -GA 遊離後の残存ペプチドの検出により、 α -GARE を
検出・測定することもできる。

このような糖化ペプチドは、特に制限されないが、例えば、FV-Leu (以下、「FVL」)、FV-Gln (以下、「FVQ」)、FV-Ala (以下、「FVA」)、FV-Asn (以下、「FVN」) 等のジペプチドがあげられる。これらは、 α -GAREによりFVが遊離し、同時にLeu、Gln、Ala、Asnがそれぞれ生成される。この生成されたLeuをロイシンデヒドロゲナーゼ、Glnをグルタメートデヒドロゲナーゼ、Alaをアラニンアミントランスフェラーゼと α ケトグルタル酸とラクテートデヒドロゲナーゼ、Asnをアスパラギンアミントランスフェラーゼと α ケトグルタル酸とマレートデヒドロゲナーゼ等とそれぞれ反応させ、NADH生成またはNAD生成を吸光度測定（波長340 nm）することによって検出できる。

また、糖化トリペプチドとしては、例えば、FV-Leu-Ser (以下、「FVLS」) 等があげられる。FVLSは、 α -GAREによりFVが遊離し、同時にLeu-Serが生成される。これを例えば、アミノペプチダーゼ、キモトリプシン、プロテナーゼK等の加水分解酵素で分解し、これにより生成したロイシンを前述と同様にして測定することができる。なお、前記ペプチドの長さは、特に制限されない。

さらに、 α -GAREの基質として、アミノ酸と検出基とを含み、前記アミノ酸の α -アミノ基が糖化され、かつ、前記検出基が前記アミノ酸の α -カルボキシル基にアミド結合またはエステル結合し、前記検出基が、結合状態では検出不可能であり、遊離すると検出可能となる基質を用いることもできる。

α -GAREは、前記基質と反応させれば、 α -GAと前記検出基とのアミド結合またはエステル結合を切断して、 α -GAと検出基とを遊離する。この切断によって遊離した前記検出基は、例えば、発色・発光

するため、これにより α -GARE を検出・測定できる。

前記検出基は、特に制限されないが、例えば、前述のように、発色や蛍光により検出できるものが好ましい。前記発色により検出できる検出基としては、パラニトロアニリド（以下、「p-NA」という）、パラニ
5 トロフェノール、インドール、 β -ナフチルアミド、4-メトキシ- β -
ナフチルアミド（4M β NA）等があげられ、前記蛍光により検出で
きる検出基としては、例えば、4-メチル-クマリル-7-アミド等が
あげられる。具体的に、p-NA やパラニトロフェノールは、例えば、
波長 405 ~ 410 nm 付近の吸光度を分光光度計等により測定すれば
10 よく、4-メチル-クマリル-7-アミドは、波長 380 nm で励起し
て波長 460 nm で測定すればよい。

なお、前記検出基と α -カルボキシル基との結合が、アミド結合であ
ってもエステル結合であっても、 α -GARE が α -GA を遊離できる
のは、 α -GARE が α -アミノ基の糖化部分を認識して α -GA を遊
15 離させるためと推測される。

このように α -カルボキシル基に検出基を結合させた α -GARE の
基質は、例えば、市販の検出基が結合したアミノ酸と糖とを用いて常法
により調製できる。

20 つぎに、本発明の α -GARE は、例えば、前述の培養方法に準じた
方法により、本発明の α -GARE 産生菌体を培養することによって製
造できる。コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FER
M P-17135) を使用する場合、その培養条件は、例えば、培養温度 2
0 ~ 37 °C の範囲、培養時間 18 ~ 72 時間の範囲、培地の pH 7.0
25 ~ 8.0 の範囲である。シュードモナス アルカリゲネス KDK1001
(FERM P-17133) を使用する場合、その条件は、例えば、培養温度

20～40℃の範囲、培養時間18～72時間の範囲、培地のpH5.0～10.0の範囲である。

また、前記培養液に含有される α -GAREを、常法により分離精製することによって、 α -GAREの酵素標品を得ることができる。 α -GAREの精製は、例えば、既知の方法である、硫酸等による塩析法、等電点沈殿法、エタノール沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等の組み合わせにより行うことができる。以下に、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) 由来 α -GAREの精製方法の一例を示す。

まず、前記培養液を遠心分離(12,000G、15min、4℃)して菌体を除去し、上清を得る。前記上清に50体積%になるように冷エタノールを添加して十分に攪拌し、4℃で約20分間放置した後、この溶液を遠心分離(12,000G、15min、4℃)する。得られた上清に、85体積%になるように、再度、冷エタノールを添加して攪拌した後、前述と同様にして、放置、遠心分離を行い沈殿を回収する。そして、この沈殿を精製水に溶解する。

この溶液を商品名ポロスHQ/M(ピーイーバイオシステムズ社製)カラムに供し、10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)により非吸着画分を溶出して回収する。そして、この非吸着画分を商品名バイオスケールCHT-I(バイオラド社製)カラムに供し、1mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)により非吸着画分を溶出して回収することによって、部分精製された本発明の α -GARE酵素溶液を得ることができる。なお、本発明のその他の新菌体由来の α -GAREも同様にして精製できる。

また、本発明の新規菌体の培養に使用する培地は、前記栄養液体培地には制限されず、この他に、例えば、以下に示すヘモグロビン (Hb) 培地を使用することもできる。なお、Hb溶液は、例えば、以下に示す方法により調製できる。

5

(Hb培地: pH 6.0)

	Hb溶液	0.2重量%
	K_2HPO_4	0.2重量%
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02重量%
10	微量金属塩溶液	1.0重量%
	微量ビタミン類溶液	0.2重量%

(Hb溶液)

新鮮血液を遠心分離 (2,000G、10分間、室温) して赤血球を
15 回収し、これに等量 (体積) の蒸留水を添加して溶血させる。この溶血液を遠心分離 (2,000G、15分間、室温) し、赤血球膜等を除去した溶液をHb溶液とする。

(微量金属塩溶液)

20	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	200mg
	H_3BO_3	50mg
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	20mg
	KI	50mg
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	100mg
25	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	200mg
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	200mg

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 mg
残分	水 (全量 500 ml)

(微量ビタミン類溶液)

5	Ca-パントテン酸	40 mg
	イノシトール	20 mg
	ナイアシン	40 mg
	p-アミノ安息香酸	20 mg
	ピリドキシン塩酸塩	40 mg
10	チアミン塩酸塩	40 mg
	ビオチン	0.2 mg
	ビタミンB ₁₂	0.05 mg
	残分	水 (全量 100 ml)

15 つぎに、本発明の糖化タンパク質または糖化ペプチドの測定方法について、血球を試料とし、前記血球中の糖化タンパク質（例えば、HbA_{1c}）を、 α -GAREおよびFAODを用いて測定する例をあげて説明する。

20 まず、全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離し、これを溶血させる。この溶血方法は特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、界面活性剤を用いる方法が好ましい。

25 前記界面活性剤としては、例えば、商品名Triton X-100等のポリオキシエチレン-p-tert-オクチルフェニルエーテル類、商品名Tween-20等のポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステ

ル類、商品名 B r i j 3 5 等のポリ（オキシエチレン）アルキルエーテル類等が使用できる。前記界面活性剤による処理条件は、例えば、処理溶液中の血球濃度が 1 ～ 1 0 体積％の場合、前記処理溶液中の濃度が 0 . 1 ～ 1 重量％になるように前記界面活性剤を添加し、室温で、5 秒～ 5 1 分程度攪拌すればよい。

つぎに、前記溶血試料に対し、本発明の α -G A R E による酵素処理を行う。これにより、前記溶血試料中の糖化タンパク質から α -G A を遊離させる。前記 α -G A R E による酵素処理は、例えば、緩衝液中で行われ、その処理条件は、使用する α -G A R E の種類（例えば、由来等の違い）や、糖化タンパク質や糖化ペプチドの種類およびそれらの濃度等により適宜決定される。

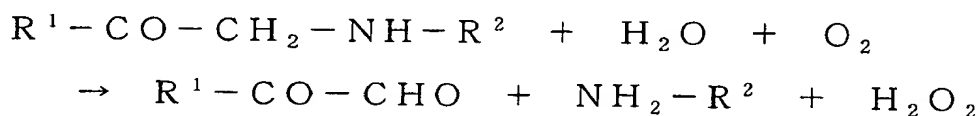
例えば、測定対象物が H b A 1 c であり、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002(FERM P-17135) 由来の α -G A R E を使用する場合、その処理条件は、例えば、反応液中の α -G A R E 濃度 0 . 0 1 U ～ 1 K U / リットル、温度 1 5 ～ 6 0 ℃、反応時間 3 分～ 6 時間、p H 5 . 0 ～ 1 0 . 0 の範囲である。また、好ましくは、それぞれ、温度 3 0 ～ 3 7 ℃、反応時間 5 ～ 6 0 分、p H 6 ～ 8 の範囲である。この場合、前記緩衝液としては、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、グッド緩衝液（E P P S 緩衝液、P I P E S 緩衝液等）等が使用できる。

20 なお、本発明のその他の新菌体由来の α -G A R E も同様にして使用できる。

つぎに、前記 α -G A R E 処理によって得られた分解物（ α -G A）を F A O D で処理する。この F A O D が触媒する、 α -G A の分解反応を、下記式（1）に示す。

25

(式1)



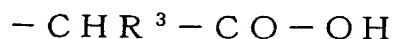
- 5 前記式(1)に示すように、前記 α -GARE処理による分解物(α -GA : $R^1-CO-CH_2-NH-R^2$)をFAOD処理することにより、糖($R^1-CO-CHO$)、アミノ酸(NH_2-R^2)および過酸化水素(H_2O_2)が生成する。

- 前記式(1)において、 R^1 は、糖化反応前の糖に由来する残基(糖残基)を意味する。前記糖残基(R^1)は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基(R^1)はグルコース残基(アルドース残基)となる。この糖残基(R^1)は、例えば、 $-[CH(OH)]_n-CH_2OH$ で示すことができ、 n は、0~6の整数である。
- 10
- 15

また、前記式(1)において、 R^2 は、 α -アミノ基が糖化されているアミノ酸残基であり、下記式(2)で示すことができる。下記式(2)において、 R^3 はアミノ酸側鎖基を示す。

20

(式2)



- 前記FAODは、前記反応を触媒するものであれば、特に制限されず、例えば、さらに他の触媒機能を有してもよい。このFAOD処理は、前記 α -GAREによる酵素処理と同様に緩衝液中で行うことが好ま
- 25

しい。前記緩衝液は特に制限されず、例えば、トリス塩酸緩衝液、EP
PS緩衝液、PIPES緩衝液等が使用できる。

前記FAODの処理条件は、例えば、反応液中のFAOD濃度0.1
~10KU/リットル、温度15~50℃、反応時間1~60分、pH
5 6~9の範囲であり、好ましくは、それぞれ、FAOD濃度0.5~2
KU/リットル、温度30~37℃、反応時間5~20分、pH7~8
の範囲である。

つぎに、前記FAOD処理で生じた過酸化水素を、前記PODおよび
酸化により発色する基質を用いて、酸化還元反応を利用して測定する。

10 前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、反応液
中の過酸化水素濃度等により適宜決定される。例えば、反応液中のPO
D濃度10U~400KU/リットル、反応温度15~40℃、反応時
間0.1~5分、pH5~10であり、より好ましくは、POD濃度5
0U~20KU/リットル、反応温度30~37℃、反応時間0.1~
15 1分、pH5~8である。また、前記緩衝液は、特に制限されず、前記
FAOD処理と同様の緩衝液等が使用できる。

前記基質として前記発色性基質を用いた場合は、その発色（反応液の
吸光度）を分光光度計で測定することにより、過酸化水素の濃度を測定
でき、これから試料中の糖化タンパク質濃度を知ることができる。

20 この測定において、各処理工程は前述のように別々に行ってもよいが
、場合によりいくつかの工程を同時に行ってもよいし、全てを同時に行
ってもよい。例えば、試料に α -GAREとFAODとを同時に添加し
て反応させることにより、 α -GARE処理と工程とFAOD処理工程
とを同時に行うことができる。また、 α -GARE分解物に、FAOD
25 とPODと発色性基質とを同時に添加して反応させることにより、FA
OD処理工程とPODを用いた発色工程とを同時に行うこともできる。

この他に、前記界面活性剤による溶血処理工程と、 α -GARE 処理工程とを同時に行うことも可能である。

(実施例)

5

(実施例 1)

この実施例は、本発明の α -GARE を産生する新菌体の培養液上清と、 α -GA を有する糖化ペプチドとを反応させて、前記糖化ペプチドから α -GA を遊離させた例である。なお、特に示さない限り、前記ス
10 クリーニング方法と同様にして、菌の培養、糖化ペプチドの分解および TLC 分析を行った。

まず、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) を、前記栄養液体培地 200 ml に植菌して、30℃で48時間振とう培養を行った。得られた培養液を、遠心分離して菌体を除去
15 し、その上清を粗酵素液とした。

前記粗酵素液 100 μ l と前記各 0.01 M 糖化ペプチド (F2P、F3P、F5P) 溶液 50 μ l とをそれぞれ混合し、37℃で一晩反応させた後、これらの反応液を TLC により分析した。この TLC 分析の結果を図 1 および図 2 に示す。図 1 において、レーン No. 1 はコントロール (FV)、レーン No. 2 はコントロール (Leu、Val、His)、レーン No. 3 は F2P 分解物、レーン No. 4 は F3P 分解物で
20 あり、図 2 において、レーン No. 1 は F2P 分解物、レーン No. 2 は F5P 分解物である。また、同図中において矢印が示すスポットの移動度を、下記表 1 に示す。

25

(実施例 2)

シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) を前記栄養液体培地に植菌し、前記実施例 1 と同様にして、菌の培養、糖化ペプチドの分解および T L C 分析を行った。この T L C 分析の結果を図 3 に示す。同図中において、レーン N o. 1 はコントロール (F V
5)、レーン N o. 2 はコントロール (L e u、V a l、H i s)、レーン N o. 3 は F 2 P 分解物、レーン N o. 4 は F 3 P 分解物である。また、同図中において矢印が示すスポットの移動度を、下記表 1 に併せて示す。

10 (表 1)

図 N o.	サンプル名	移動度
図 1	コントロール F V	0. 4 3
	F 2 P 分解物	0. 4 3
	F 3 P 分解物	0. 4 3
15	図 2	F 2 P 分解物
		0. 4 4
	F 5 P 分解物	0. 4 4
	図 3	コントロール F V
		0. 4 6
	F 2 P 分解物	0. 4 6
	F 3 P 分解物	0. 4 6

20

図 1、図 2 および図 3 ならびに前記表 1 に示すように、前記各粗酵素液により処理した糖化ペプチド分解物において、コントロール F V と同じ移動度でスポットが確認できた (矢印で示すスポット)。また、実施例 2 における F 5 P 分解物も、F V と同じ移動度でスポットが確認できた
25 (移動度 0. 4 6 : 図示せず)。以上のことから、本発明の α -G A R E により、糖化ペプチドから α -G A が遊離することがわかった。さらに

、前記分解物のスポットが、V a lの移動度とは異なることから、 α -G A R Eにより遊離されたF Vから糖が乖離されていないこともわかった。また、図1、図2および図3に示すように、F 2 P分解物では、F VとH i sのスポットが見られた。F 3 P分解物およびF 5 P分解物において、F V以外の分解物（ジペプチドおよびテトラペプチド）のスポットが見られないのは、このT L Cの方法では検出されにくいためと推測できる。

（実施例3）

10 この実施例は、本発明の新規菌体由来の粗酵素により糖化ペプチドを処理し、 α -G A（F V）の遊離を確認した例である。

15 コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002（FERM P-17 135）を、前述のH b培地（p H 6. 0）で2 8℃、5日間培養した。そして、培養液を遠心分離（1 2, 0 0 0 G、1 5分間、4℃）し、得られた上清を粗酵素液とした。

前記粗酵素液と0. 0 1 M F 4 P溶液5 0 μ lとを混合し、3 7℃で一晩反応させた。この反応液を、限外ろ過膜（分画分子量5 k D a：ミリポア社製）に供してタンパク質等の高分子量物質を除去し、得られた溶液を凍結乾燥した。

20 前記各凍結乾燥品を下記溶離液A 2 0 μ lに溶解し、この溶液を下記条件で逆相クロマトグラフィーに供し、分析開始から1 5秒ごと（2 5 0 μ l／1フラクション）に分画した。また、コントロールとしてF Vを同条件で溶出させ、その溶出時間も確認した。

25 （逆相クロマトグラフィー）

カラム ； 商品名H y p e r c a r b（ジーエルサイエンス社製）

サイズ ; 100 mm × 4.6 mm

ループ ; 1000 μ l

溶離液A ; トリフルオロ酢酸 : 蒸留水 = 0.1 : 100 (体積比)

溶離液B ; アセトン : 蒸留水 : トリフルオロ酢酸

5 = 80 : 20 : 0.1 (体積比)

グラジエント条件 ; 0分 ~ 25分 : 0 - 20体積%溶離液B

25分以降 : 20体積%溶離液B

流速 ; 1 ml / 分

カラム温度 ; 37℃

10 検出波長 ; 210 nm、230 nm

そして、前記逆相クロマトグラフィーにより得られた各分離フラクションについて、以下に示す方法によりFVの検出を行った。

15 (FVの検出方法)

各分離フラクション溶液20 μ lに過酸化水素水溶液20 μ l添加した後、下記酸化還元反応液A 60 μ lを添加して37℃で反応させた。そして、生化学自動分析装置：商品名JCA-BM8（日本電子社製、以下同じ）を用いて、前記反応液の主波長694 nmおよび副波長8

20 84 nmにおける吸光度を測定した。

(酸化還元反応液Aの組成)

商品名DA64

20 μ mol / リットル

(和光純薬工業社製、以下同じ)

25 POD (Type III : 東洋紡績社製、以下同じ) 20 KU / リットル

FAOD (旭化成社製)

0.5 KU / リットル

リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) 0.1 mol / リットル

この結果、逆相クロマトグラフィーにおける溶出時間 5 ~ 6 分の分離
フラクションにおいて、発色が確認された。この溶出時間は、コントロ
ール F V の溶出時間と同様であり、F 4 P の分解物に F V が存在するこ
5 ことが示唆された。

つぎに、発色が確認された分離フラクションについて、以下に示す条
件により液相クロマトグラフィー (LC) / マススペクトル (MS) 分
析を行った。この結果を、図 4 および図 5 に示す。図 4 は、トータルイ
10 オンクロマトグラムであり、図 5 は、溶出時間 1.84 分における溶出
物の MS スペクトラムである。

(LC 条件)

15 カラム ; 商品名イナートシル ODS 3
(ジーエルサイエンス社製)
サイズ ; 長さ 150 mm、内径 2.1 mm、
ODS 担体の粒径 5 μ m
溶離液 ; アセトニトリル : 0.1 体積 % ギ酸水溶液
= 10 : 90 (体積比)
20 流速 ; 0.2 ml / 分
カラム温度 ; 40 $^{\circ}$ C

(MS 条件)

25 モデル ; 商品名 LC1100MSD
(アジレントテクノロジー社製)
マスレンジ ; 100 - 500 am

イオン化 ;

ネブライザー : N_2

Drying gas : N_2

(10リットル/分、350℃)

5 印加電圧 : 60V

この結果、図4および図5に示すように、3つのピークが検出された。詳しくは、溶出時間1.84分に、FVを示す質量数280のピークと、質量数261のFVの擬分子ピークが検出された。大部分が質量数
10 280のピークであり、これはFVを示すピークであることから、F4Pが分解されてFVが生成されていることが確認できた。

(実施例4)

この実施例は、 α -GARE濃度を変化させて、各濃度における α -
15 GARE活性を確認した例である。

(1) 部分精製酵素の調製

コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) およびシュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) を前記実施例3と同様にしてそれぞれ培養した。そして、各
20 培養液から上清を回収して粗酵素液とした。これらの粗酵素液50mlを、それぞれ分画分子量サイズ5kDaの限外ろ過膜(商品名ウルトラフリーMCフィルター: ミリポア社製)を用いて濃縮した後、以下に示す条件のゲルクロマトグラフィーに供して部分精製した。

25

(ゲルカラムクロマトグラフィー)

カラム : 商品名 Hi Load 26/60 Superdex
200 pg (バイオラッド社製)

カラムサイズ : 内径 260 mm、長さ 600 mm

流速 : 5.2 ml/分

5 検出波長 : 280 nm、230 nm

溶離液 : 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)

1 フラクション : 7 ml

(2) α -GARE 活性の測定

- 10 コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) 由来 α -GARE の基質として下記 HbA1c 消化物溶液を、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) 由来 α -GARE の基質として 10 mM F3P (50 mmol/l リットル リン酸カリウム緩衝液: pH 8.0) を、それぞれ使用した。前記各基
- 15 質 50 μ l に対して、各部分精製 α -GARE を所定量 (25、50、75、100、125、140 μ l) 添加して 37°C で一晩反応させ、この反応溶液 20 μ l について前記実施例 3 と同様にして FAOD を用いた酸化還元反応を行い、吸光度を測定した。そして、 α -GARE 無添加の場合をブランクとし、5 分間当たりの吸光度増加量を α -GAR
- 20 E 活性として求めた。この結果を図 6 および図 7 に示す。図 6 は、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) 由来 α -GARE の酵素量と発色量 (吸光度) との関係を表すグラフであり、図 7 は、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) 由来 α -GARE の酵素量と発色量 (吸光度) との関係を表すグラフである。
- 25

(HbA1c 消化物溶液)

人の全血を生理食塩水 (0.85 重量% NaCl) で洗浄し、血球を回収した。この血球に10倍体積量の精製水を加えて完全に溶血させてから、遠心分離 (10,000 G、30分) により血球膜を分離し、溶血液を得た。前記溶血液について、Hb量で7.5mgずつ、カラムサイズ0.94cm×20cmの商品名PolyCATカラム (ポリLC社製) を用いて、ピッセとウィランドの方法 (J.Chromatogr,(1988), Vol434,p95-110,Bisse&Wieland) に基づき分離を行い、HbA1cを回収した。回収したHbA1c (ヘモグロビン濃度17g/リットル) 20mlと0.2M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH3.0) 5mlとを混合し、酢酸でpH3.0に調整した後、ペプシン (シグマ社製) 0.35mgを添加した。この溶液を28℃で一晩インキュベートした後、限外ろ過膜 (商品名ウルトラフリーMCフィルター: ミリポア社製) を用いてペプシン等の高分子量物質を除去し、得られた溶液をHbA1c消化物溶液とした。

図6に示すように、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) 由来 α -GARE は、酵素量約50~100 μ l の範囲で酵素量に依存して活性が増加した。図7に示すように、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) 由来の α -GARE は、酵素量約70 μ l 以上の添加により、活性が直線性を持って増加した。

(実施例5)

この実施例は、本発明の α -GARE について熱安定性を確認した例である。

前記実施例 4 と同様に、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) α -GARE およびシュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) 由来 α -GARE の部分精製酵素を調製した。予め、前記両部分精製酵素を各温度 (30、37、50、60、70、80℃) で 15 分間インキュベート、熱処理後の部分精製酵素 100 μ l および基質 50 μ l を混合して、37℃で一晩反応させた。なお、それぞれの α -GARE に対する前記基質は、前記実施例 4 と同様のものを使用した。この反応溶液 20 μ l について前記実施例 3 と同様に FAD を用いた酸化還元反応を行い、吸光度を測定した。そして、5 分間当たりの吸光度の増加量を α -GARE 活性とし、未処理の α -GARE の活性を 100% とした場合の残存活性 (%) を求めた。この結果を図 8 および図 9 に示す。図 8 は、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) 由来 α -GARE の熱安定性を示すグラフであり、図 9 は、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) 由来 α -GARE の熱安定性を示すグラフである。

図 8 に示すように、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) 由来の α -GARE は、30~60℃の熱処理によっても 100% の残存活性を示したが、80℃での熱処理によって、残存活性が 50% に低減した。また、図 9 に示すように、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) 由来の α -GARE も 30~60℃の熱処理によっても 100% の残存活性を示したが、70℃での熱処理によって、残存活性が約 60% に低減した。

25 (実施例 6)

この実施例は、本発明の α -GARE について至適温度を確認した例

である。

前記実施例 4 と同様にして、コリネバクテリウム ウレオリティカム
KDK1002 (FERM P-17135) 由来 α -GARE の部分精製酵素を
調製した。この部分精製酵素 100 μ l を、前記実施例 5 と同様の Hb
5 A1c 消化物溶液 90 μ l およびリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0)
10 μ l の混合液に添加し、各温度 (10、30、37、50、60、
70℃) で一晩反応させた。この反応溶液 20 μ l について、前記実施
例 3 と同様にして FAOD を用いた酸化還元反応を行い、吸光度を測定
した。そして、5 分間当たりの吸光度の増加量を α -GARE 活性とし
15 た。この結果を図 10 に示す。図 10 は、コリネバクテリウム ウレオ
リティカム KDK1002 (FERM P-17135) 由来 α -GARE の至適
温度を示すグラフである。

図 10 に示すように、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK
1002 (FERM P-17135) 由来の α -GARE の至適温度は、約 40
15 ~ 50℃ であった。

(実施例 7)

この実施例は、本発明の α -GARE の分子量を確認した例である。

前記実施例 3 と同様にして、コリネバクテリウム ウレオリティカム
20 KDK1002 (FERM P-17135) およびシュードモナス アルカリゲ
ネス KDK1001 (FERM P-17133) を培養し、その上清を回収して
粗酵素液とした。そして、これらの粗酵素液を、それぞれ、前記実施例
4 と同じ条件のゲルクロマトグラフィーに供して、分離をおこなった。
そして、各フラクション 150 μ l を、基質 50 μ l および 50 mM リ
25 ン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) の混合液に添加し、37℃ で一晩反
応させた。それぞれの α -GARE に対する前記基質は、前記実施例 4

と同様のものを使用した。この反応溶液 $20 \mu\text{l}$ について前記実施例 3 と同様にして F A O D を用いた酸化還元反応を行い、吸光度を測定した。そして、5 分間当たりの吸光度の増加量を α -G A R E 活性とした。なお、分子量マーカーとして商品名 MW マーカー (H P L C) (オリエンタル酵母社製) を使用した。

この結果、両粗酵素液とも、分子量約 $40,000 \sim 50,000$ に相当するフラクションに α -G A R E 活性が見られたことから、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135) α -G A R E およびシュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (FERM P-17133) 由来 α -G A R E の分子量は、それぞれ約 $40,000 \sim 50,000$ と推測される。

(実施例 8 および比較例 1)

この実施例は、実施例 1 および実施例 2 と同じ α -G A R E 粗酵素液により糖化ペプチドを処理し、その処理物に対して F A O D 等を用いた酸化還元反応を行うことにより、前記粗酵素液の α -G A R E 活性を測定した例である。使用した試薬、その組成および方法を以下に示す。

(50 mM 糖化ペプチド溶液)

前記 F 2 P を、50 mM の濃度になるように蒸留水に溶解した。

(緩衝液 A)

80 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)

25

(酸化還元反応液 B の組成)

商品名 D A 6 4	0. 1 m m o l / リットル
P O D	5 0 K U / リットル
F A O D (キッコーマン社製)	1 0 K U / リットル
緩衝液 A	8 0 m m o l / リットル

5

前記実施例 1 および実施例 2 と同様にして調製した粗酵素液 4 9 0 μ l と前記糖化ペプチド溶液 1 0 μ l とを混合し、3 0 $^{\circ}$ C で一晩反応させて前記糖化ペプチドの分解を行った。この分解液 2 5 μ l に前記緩衝液 A 5 5 μ l を添加した後、前記酸化還元反応液 B 2 0 μ l を混合して反応を開始し、主波長 6 9 4 n m、副波長 8 8 4 n m におけるこの反応液の吸光度を生化学自動分析装置：商品名 J C A - B M 8 (日本電子社製) を用いて測定した。そして、予め、標準物質として F V を用いて F A O D による反応を行い作成した検量線と、前記吸光度とから、 α -G A R E の活性を求めた。この結果を、下記表 2 に示す。なお、トリプシン (シグマ社製)、パパイン (シグマ社製) およびアミノペプチダーゼ (シグマ社製) を 1 g / リットルの濃度になるように精製水に溶解したものを、それぞれ酵素液として用いた以外は、前述と同様にして α -G A R E 活性の測定を行ったものを比較例 1 とした。

20 (表 2)

菌体名			α -G A R E 活性 (U / リットル)
コリネバクテリウム	ウレオリティカム	KDK1002	1. 4 3
シュードモナス	アルカリゲネス	KDK1001	0. 2 6

25

前記表 2 に示すように、前記二種類の新菌体由来の粗酵素液を用いた

場合、 α -GARE活性が確認されたが、トリプシン、パパインおよびアミノペプチダーゼをそれぞれ用いた比較例1では、 α -GARE活性は検出できなかった。

5 (実施例9)

この実施例は、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135)由来の α -GARE酵素溶液により糖化グロビンを処理し、その処理物を、FAODを用いた酸化還元反応を行うことにより、 α -GARE活性を測定した例である。使用した試薬、その組成
10 および方法を以下に示す。

(α -GARE酵素溶液の調製方法)

コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (FERM P-17135)を、前記栄養液体培地200mlに植菌して、30℃で48時間
15 振とう培養を行い、得られた培養液から遠心分離により菌体を除去し、その上清を回収した。そして、この上清を、前述と同様にして、商品名ポロスHQ/M(ピーイーバイオシステムズ社製)カラムおよび商品名バイオスケールCHT-I(バイオラド社製)カラムに供し、 α -GAREの部分精製を行い、得られた活性画分を α -GARE酵素溶液とし
20 た。

(糖化グロビンの調製方法)

ヒト血球より、前述のテールの方法に従いグロビンを精製した。そして、このグロビンに対し、グルコースを10重量%の濃度になるように
25 添加して、40℃で一週間放置することにより糖化グロビンを調製した。

予め、前記糖化グロビンを、蒸留水に2 g／リットルの濃度になるように溶解して、糖化グロビン溶液を調製した。そして、前記 α -GARE酵素溶液100 μ l、前記糖化グロビン溶液50 μ lおよび100 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0) 350 μ lを混合し、37℃で3時間反応させて糖化グロビンの分解を行った。この分解液を用いて、前記実施例8と同様にして α -GAREの活性を求めた。なお、前記FAOD(キッコーマン社製)は、 α -GAに特異的に作用するため、前記コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002(FERM P-17135)由来の α -GAREが、 α -GA以外に、例えば、 ϵ -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基等を遊離させていても、 α -GARE活性のみを測定することができる。その結果、 α -GARE活性は2.1 U／リットルであった。

(実施例10)

この実施例は、基質としてFV-pNAを用いて α -GARE活性を測定した例である。

実施例1と同様にしてコリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002(FERM P-17135)由来の粗酵素液を調製した。前記粗酵素液400 μ lおよび下記反応試薬C100 μ lを混合して37℃で反応させ、 α -GAREにより遊離されるpNAの発色を波長410 nmにおける吸光度変化として測定した。そして、1分間当たりの吸光度変化を α -GARE活性として求めた。この結果を下記表3に示す。

(FV-pNAの調製)

Va1-pNA(シグマ社製)とグルコースとから、常法によりFV-pNAを調製した。

(反応試薬 C)

F V - p N A 1 m l

5 0 m M リン酸カリウム緩衝液 (p H 8 . 0) 2 0 m l

5

(表 3)

試料	α - G A R E 活性
(一分間当たりの吸光度増加量)	
実施例 1	0 . 0 0 3 0
10 コントロール	0 . 0 0 0 5

前記表 3 に示すように、本発明の α - G A R E 活性は、アミノ酸の α 位アミノ基が糖化され、かつ、 α 位カルボキシル基にアミド結合により検出基が結合しているアミノ酸基質により、測定することもできる。

15

このように、本発明の α - G A R E によれば、 α - G A が遊離し、F A O D が作用しやすくなるため、糖化タンパク質や糖化ペプチドの測定を精度良く行うことができる。

20 産業上の利用可能性

このように本発明の新規酵素である α - G A R E は、糖化タンパク質等から、 α - アミノ基が糖化されたアミノ酸残基を遊離させることができる。したがって、例えば、前記 α - G A R E を、F A O D を用いた糖化タンパク質等の測定方法に使用すれば、糖尿病診断の指標となる H b A 1 c の測定を正確かつ簡便に行うことができるため、H b A 1 c の測定を臨床検査等において実用化することが可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 糖化タンパク質または糖化ペプチドから、 α -アミノ基が糖化されたアミノ酸を遊離させる新規酵素。
- 5 2. コリネバクテリウム属 (Corynebacterium) の菌体由来である請求項 1 記載の酵素。
3. コリネバクテリウム属の菌体が、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (Corynebacterium ureolyticum KDK1002) (FERM P-17135) である請求項 2 記載の酵素。
- 10 4. シュードモナス属 (Pseudomonas) の菌体由来である請求項 1 記載の酵素。
5. シュードモナス属の菌体が、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (Pseudomonas alcaligenes KDK1001) (FERM P-17133) である請求項 4 記載の酵素。
- 15 6. 遊離される糖化アミノ酸が、 α -アミノ基が糖化されたバリンである請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の酵素。
7. 糖化タンパク質または糖化ペプチドを酵素で分解した後、この分解物とフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとを反応させ、この酸化還元反応を測定することにより、前記糖化タンパク質または糖化ペプチドの
- 20 量を測定する方法であって、前記酵素として請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の酵素を使用する測定方法。
8. 測定対象物である糖化タンパク質が、糖化ヘモグロビンである請求項 7 記載の測定方法。
9. プロテアーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、ペルオキシ
- 25 ダーゼおよびこれとの反応により酸化される基質を備える糖化タンパク質または糖化ペプチドの測定キットであり、前記プロテアーゼが、請求

項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の酵素を含む測定キット。

10. コリネバクテリウム属 (Corynebacterium) の菌体であって、糖化タンパク質または糖化ペプチドから、 α -アミノ基が糖化されたアミノ酸を遊離させる酵素を産生する菌体。

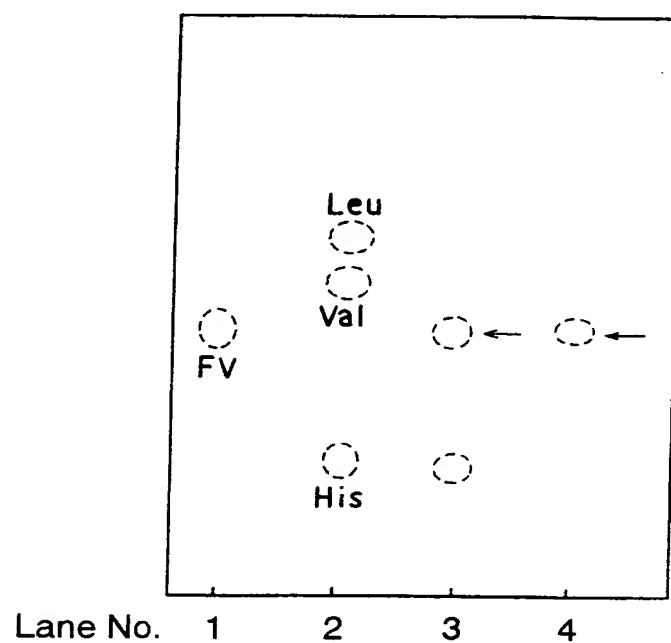
- 5 11. コリネバクテリウム属の菌体が、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (Corynebacterium ureolyticum KDK1002) (FERM P-17135) である請求項 10 記載の菌体。

12. シュードモナス属 (Pseudomonas) の菌体であって、糖化タンパク質または糖化ペプチドから、 α -アミノ基が糖化されたアミノ酸を
10 遊離させる酵素を産生する菌体。

13. シュードモナス属の菌体が、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (Pseudomonas alcaligenes KDK1001) (FERM P-17133) である請求項 12 記載の菌体。

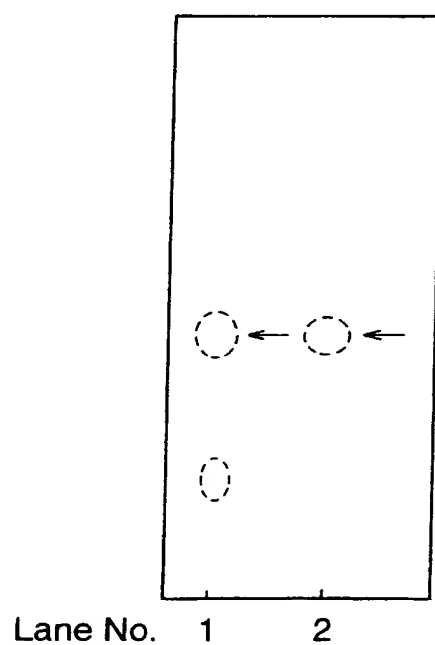
14. 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の酵素を検出またはその活性を測定するための基質であって、アミノ酸と検出基とを含み、前記アミノ酸の α -アミノ基が糖化され、かつ、前記検出基が前記アミノ酸の α -カルボキシル基にアミド結合またはエステル結合し、前記検出基が、結合状態では検出不可能であり、遊離すると検出可能となる基質。
15

15. 検出基が、パラニトロアニリド、パラニトロフェノール、 β -ナフチルアミド、4-メトキシ- β -ナフチルアミドおよび4-メチル-クマリル-7-アミドからなる群から選択された少なくとも一つの検出基である請求項 14 記載の基質。
20



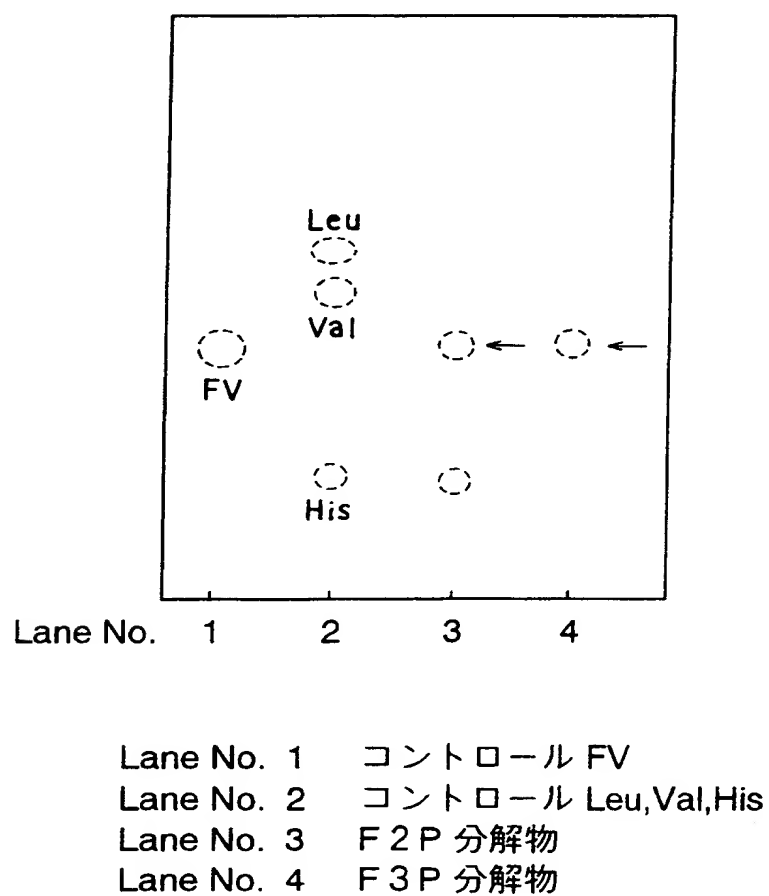
Lane No. 1 コントロール FV
Lane No. 2 コントロール Leu,Val,His
Lane No. 3 F2P 分解物
Lane No. 4 F3P 分解物

F i g . 1



Lane No. 1 F2P 分解物
Lane No. 2 F5P 分解物

F i g . 2



F i g . 3

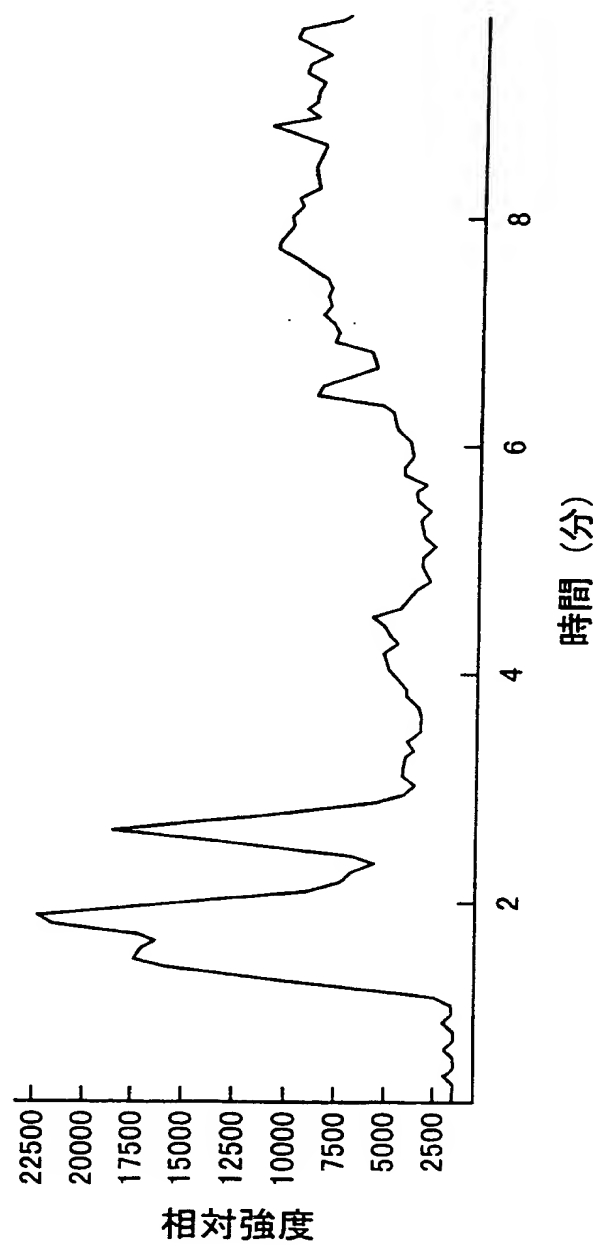


Fig. 4

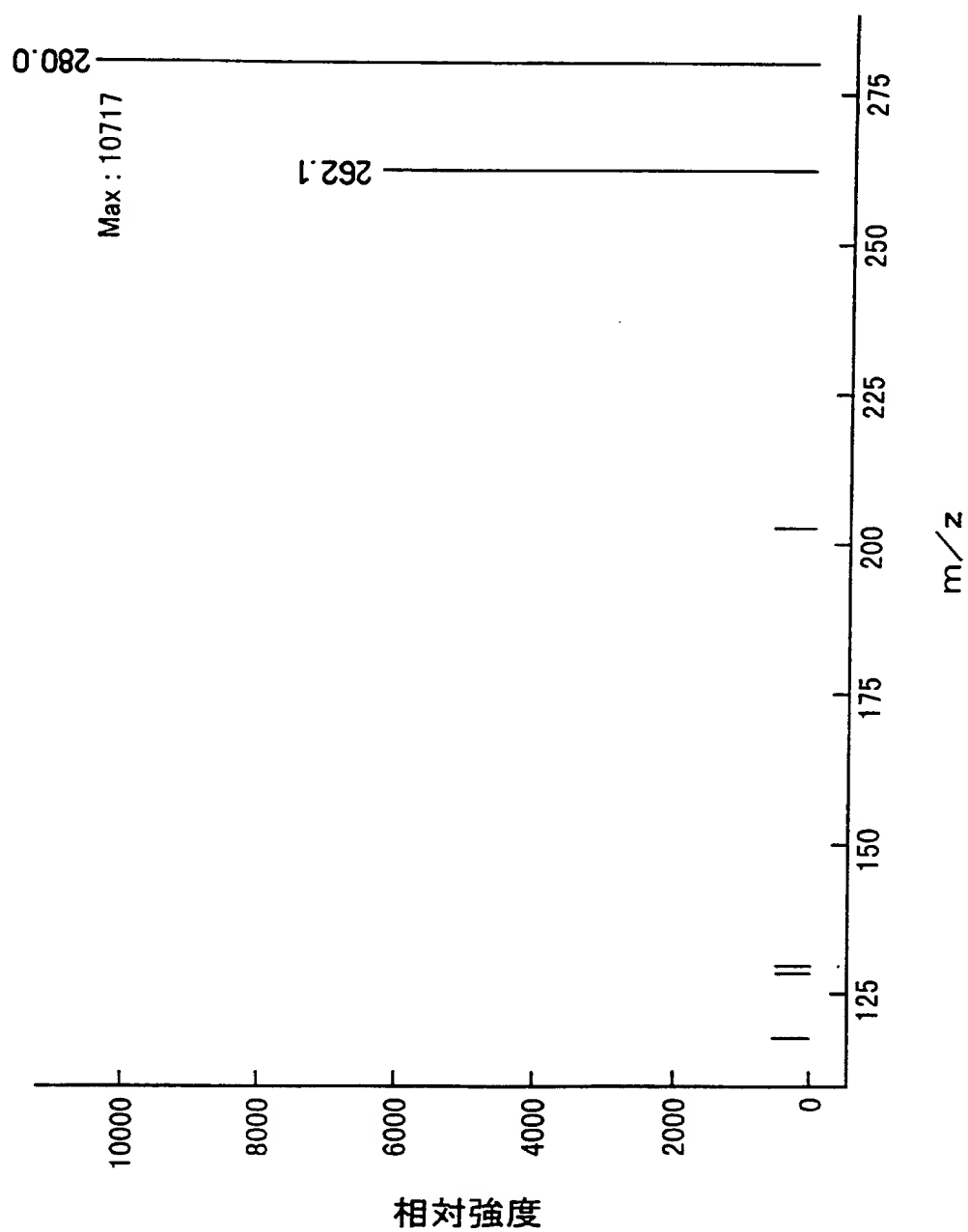
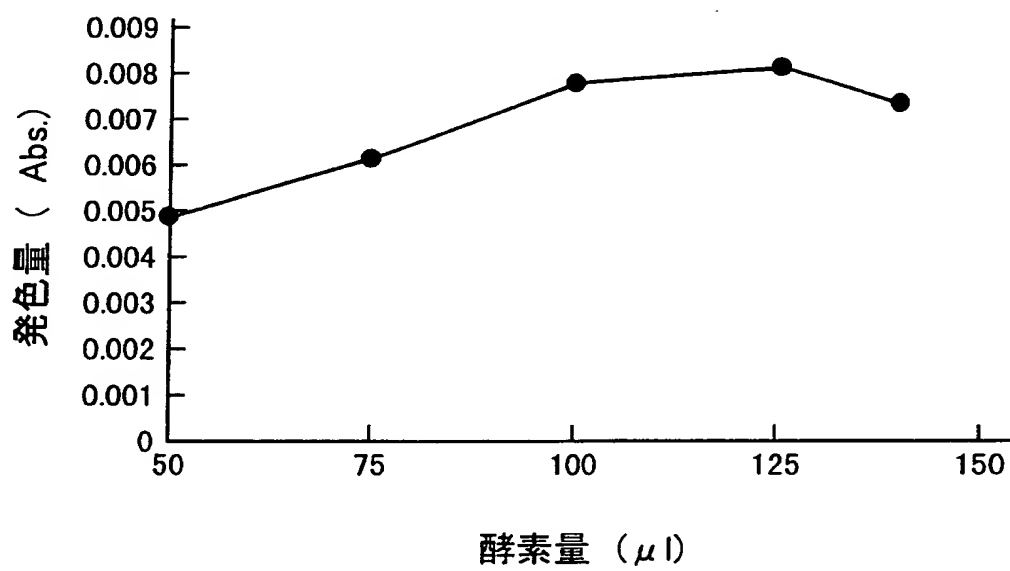


Fig. 5



F i g . 6

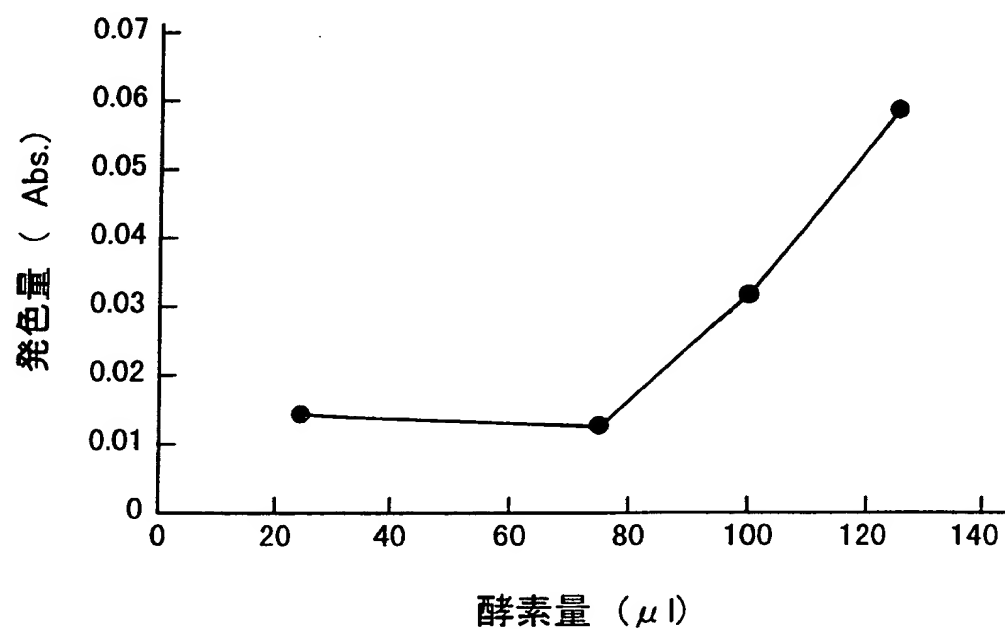
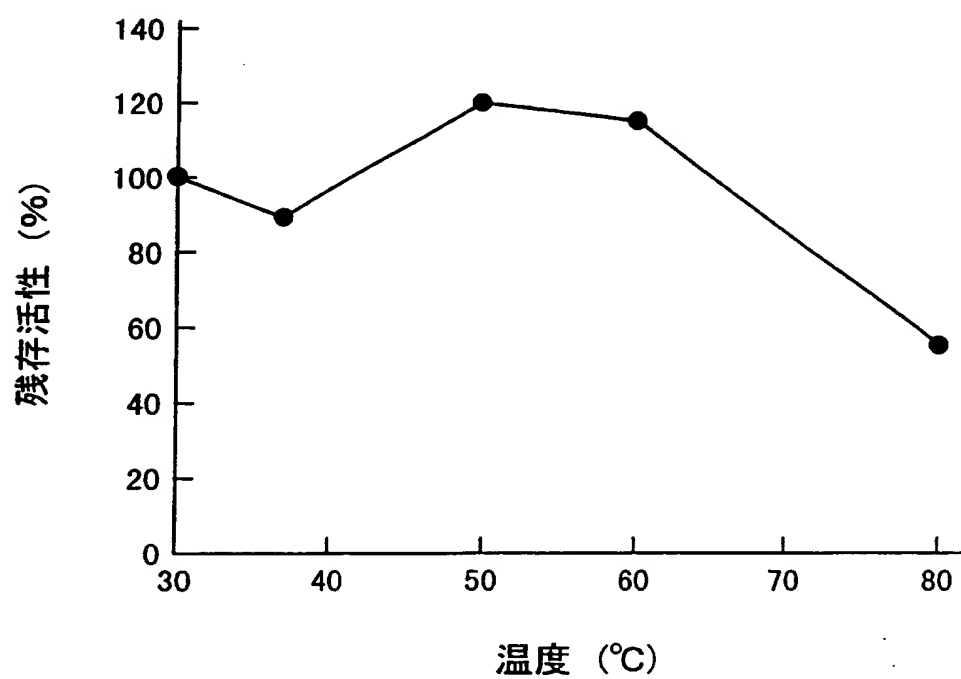
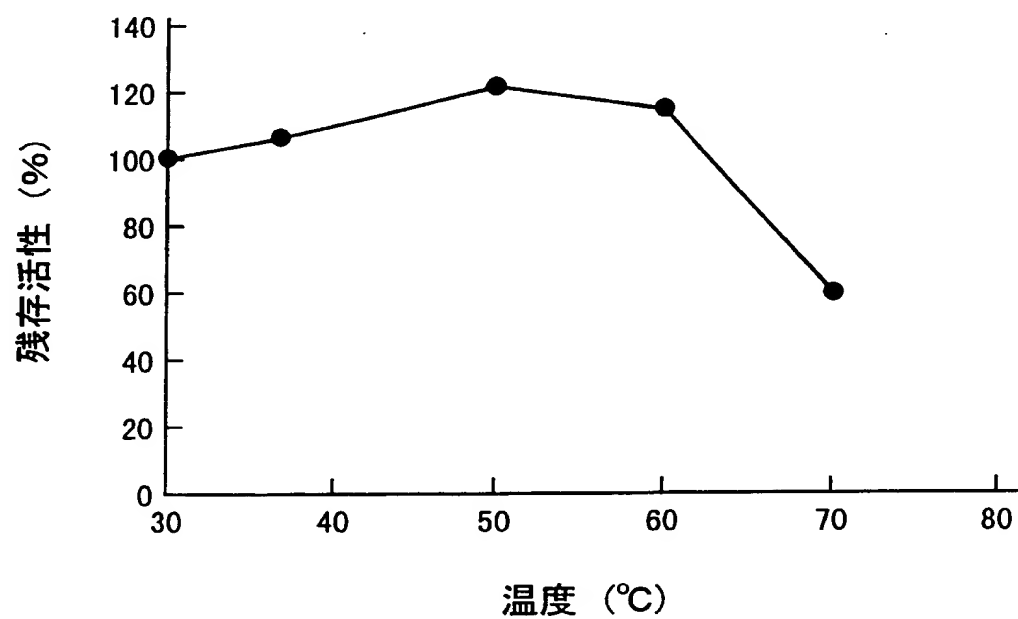


Fig. 7





F i g . 8



F i g . 9

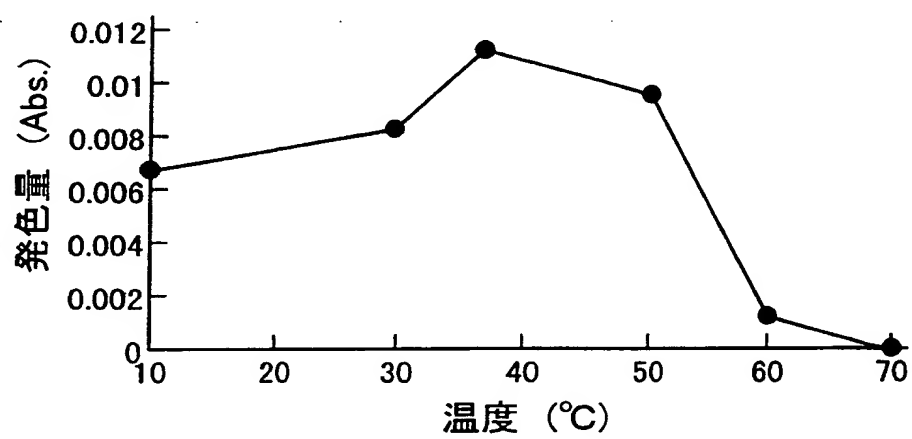


Fig. 10

10/10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/48, C12N1/20, C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/48, C12N1/20, C12Q1/37

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Biosis Previews (Dialog)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 5370990, A (Genzyme UK LTD.)	1, 6-9
Y	03. December. 1994 (03.12.1994), column 3, lines 31 to 37	2, 4, 10, 12
A	&EP, 526150, A &AU, 9220457, A &CA, 2074772, A &JP, 5-192193, A &DE, 69211439, E	3, 5, 11, 13-15
Y	SHIN, S-W. "Identification of the Protease Producing	4, 12
A	Bacteria to Use Fish Meal Wastewater and the Producing Conditions for the Enzyme." Bull. Korean Fish. Soc., 1989, Vol. 22, No. 3, pages 138 to 146	5, 13
Y	JP, 63-279782, A (Onoda Cement CO. LTD.),	2, 10
A	16. November. 1988 (16.11.1988), (Family: none)	3, 11
Y	JP, 50-019628, B1 (Sumitomo Chem. Ind. KK.),	4, 12
A	08. July. 1975 (08.07.1975), (Family: none)	5, 13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 May, 2000 (09.05.00)Date of mailing of the international search report
06.06.00Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



11

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/00984

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N9/48, C12N1/20, C12Q1/37

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N9/48, C12N1/20, C12Q1/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Biosis Previews (Dialog)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	US, 5370990, A (Genzyme UK LTD.) 1994. 12. 03, column3, lines 31 to 37&EP, 526150, A&AU, 9220457, A&CA, 2074772, A&JP, 5-192193, A&DE, 69 211439, E	1, 6-9 2, 4, 10, 12 3, 5, 11, 13-15
<u>Y</u> A	SHIN, S-W. 'Identification of the Protease Producing Bacteria to Use Fish Meal Wastewater and the Producing Conditions for the Enzyme.' Bull. Korean Fish. Soc., 1989, Vol. 22, No. 3, pages 138 to 146	4, 12 5, 13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 05. 00

国際調査報告の発送日

06.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平田 和男

4 B

7 8 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP, 63-279782, A (Onoda Cement CO. LTD.) 1988. 11. 16, (ファミリーなし)	2, 10 3, 11
<u>Y</u> A	JP, 50-019628, B1 (Sumitomo Chem. Ind. KK.) 1975. 07. 08, (ファミリーなし)	4, 12 5, 13